

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1904

THÈSE

N° —

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le mercredi 6 juillet 1904 à 1 heure

PAR

Robert CAMBIER

né à Paris le 21 septembre 1869

Licencié ès-sciences physiques

Ancien préparateur de travaux pratiques de chimie à la Faculté de Médecine

Sous-directeur du laboratoire de Bactériologie de la Ville de Paris

Inspecteur des Etablissements classés

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DES

Eaux alimentaires

MÉTHODE DE RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE

Stérilisation par filtration sur lits oxydants insolubles

Président : M. GAUTIER, professeur.

*Juges : { MM. HAYEM, professeur.
WIDAL et DESGREZ, agrégés.*

Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

H. JOUVE

15, rue Racine, 15

—
1904

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen		M. DEBOVE.
Professeurs		MM.
Anatomie.....		P. POIRIER
Physiologie.....		Ch. RICHET.
Physique médicale.....		GARIEL.
Chimie organique et Chimie minérale.....		GAUTIER.
Histoire naturelle médicale.....		BLANCHARD
Pathologie et thérapeutique générales.....		BOUCHARD
Pathologie médicale.....	}	HUTINEL.
Pathologie chirurgicale.....		BRISSAUD.
Anatomie pathologique.....		LANNELONGUE
Histologie.....		CORNIL.
Opérations et appareils.....		MATHIAS DUVAL
Pharmacologie et matière médicale.....		RECLUS.
Thérapeutique.....		POUCHET.
Hygiène.....		GILBERT.
Médecine légale.....		CHANTEMESSE
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....		BROUARDEL
Pathologie expérimentale et comparée.....		DEJERINE.
Clinique médicale.....	}	HAYEM.
		DIEULAFOY.
		DEBOVE.
		LANDOUZY.
Maladie des enfants.....		GRANCHER.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale.....		JOFFROY.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....		GAUCHER.
Clinique des maladies du système nerveux.....		RAYMOND.
Clinique chirurgicale.....	}	TILLAX.
		LE DENTU.
		TERRIER.
Clinique ophtalmologique.....		BERGER.
Clinique des maladies des voies urinaires.....		DE LAPERSONNE
Clinique d'accouchements.....	}	GUYON.
		BUDIN.
Clinique gynécologique.....		PINARD.
Clinique chirurgicale infantile.....		POZZI.
		KIRMISSON
Agrégés en exercice.		
MM.		
ACHARD	FAURE	LEGUEU
AUVRAY	GILLES DE LA	LEPAGE
BEZANCON	TOURETTE	MARION
BONNAIRE	GOSSET	MAUCLAIRE
BROCA (Aug.).	GOUGET	MERY
BROCA (André)	GUIART	POTOCKI
CHASSEVANT	HARTMANN	REMY
CUNEO	JEANSELME	RENON
DEMELIN	LANGLOIS	RICHAUD
DESGREZ	LAUNOIS	RIEFFEL (chef
DUPRE	LEGREY	des travaux anat.)
		TEISSIER
		THIERY
		THIROLOIX
		THOINOT
		VAQUEZ
		WALLICH
		WALTHER
		WIDAL
		WURTZ

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MONSIEUR LE DOCTEUR PIERRE MIQUEL

Directeur du Service micrographique
de l'Observatoire municipal de Montsouris.

A MONSIEUR LE DOCTEUR M. HANRIOT

Membre de l'Académie de Médecine,
Professeur agrégé à la Faculté de Médecine.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR ARMAND GAUTIER

Membre de l'Institut,

Membre de l'Académie de Médecine.

DU MÊME AUTEUR

Contribution à l'étude de la fermentation ammoniacale. Ann. de microgr., V, p. 323.

Etudes sur la résistance des germes bactériens à la chaleur sèche. Ann. de microgr., VIII, p. 49.

Sur une nouvelle fermentation lactique à la température de 70°. Rev. de phys. et de chim., 1897, p. 221.

Sur une méthode de recherche du bacille typhique. C.-R. Acad. des Sciences, 1901, CXXXII, p. 1442.

Nouvelle contribution à la recherche du bacille typhique. C.-R. Acad. des Sciences, 1901, CXXXIII, p. 1226.

Note sur la recherche du bacille typhique. Revue d'hygiène, 20 janvier 1902.

En collaboration avec M. Trillat.

Nouveaux dérivés méthyléniques. C.-R. Acad. des Sciences, 4 juin 1896.

Action du trioxyméthylène sur les alcools en présence du perchlorure de fer. Bull. de la Soc. chimique, XI, p. 749.

Ethers méthyléniques des alcools et des glycols de la série grasse. Bull. de la Soc. chimique, XI, p. 752 et p. 817.

En collaboration avec M. Brochet.

Sur un appareil producteur d'aldéhyde formique gazeuse. C.-R. Acad. des Sciences, 8 oct. 1894, et Annales de micrographie, VI, p. 539.

Sur la désinfection des locaux par l'aldéhyde formique gazeuse. Acad. de méd., 18 décembre 1894. Ann. de microgr., VII, p. 89. Revue d'hygiène avril 1895.

Sur la constitution de l'hexaméthylène amine, C.-R. Acad. des Sciences, 14 janvier 1895. Bull. de la Soc. chimique. XIII, p. 99, et 209.

Action de la formaldéhyde sur le chlorhydrate d'hydroxylamine et sur le chlorhydrate de monométhylamine. C.-R. Acad. des Sciences, 24 février 1895.

Action de la formaldéhyde sur les sels ammoniacaux. C.-R. Acad. des Sciences, 11 mars 1895.

Action de la formaldéhyde sur les amines et sur leurs sels. Bull. Soc. chim. XIII, p. 392.

Préparation de la mono et de la triméthylamine. Bull. de la Soc. chimique, XIII, p. 533.

En collaboration avec M. le D^r Miquel :

Traité de Bactériologie pure et appliquée. Paris, 1902, G. Carré, édit., 1 vol. in-8° de 1060 pages.

Recherches sur la communication directe des sources de la vallée de la Vanne captées par la ville de Paris avec les cours d'eau superficiels et les nappes souterraines. Trav. de la Commission scientifique de perfectionnement de l'Observatoire municipal de Montsouris, années 1899-1900, p. 343 ; années 1900-1901, p. 259.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
EAUX ALIMENTAIRES

Méthode de recherche du bacille typhique

Sterilisation par filtration sur lits oxydants insolubles.

INTRODUCTION

Le présent Mémoire résume les travaux personnels que j'ai pu effectuer au cours des trois dernières années au laboratoire de bactériologie de l'Observatoire municipal de Montsouris. Il contient : 1^o L'exposé d'une méthode de recherche du bacille d'Eberth basée sur la propriété que possède ce bacille de traverser rapidement, dans certaines conditions de culture, la paroi poreuse des bougies filtrantes de porcelaine ; 2^o la description d'un procédé de stérilisation absolue des eaux parfaitement applicable à la production des volumes énormes d'eau réclamés pour l'alimentation

des villes ou aux besoins plus restreints de l'alimentation domestique.

La méthode de recherche du bacille d'Eberth a déjà fait de ma part l'objet de quelques brèves publications (1) qui malgré leur laconisme ont engagé plusieurs bactériologistes, soit en France, soit à l'étranger, à l'étudier et à l'appliquer, souvent avec succès. Mon plus grand désir serait que, telle que je la publie aujourd'hui, elle soit de quelque utilité pour l'appréciation, toujours si délicate, de la valeur hygiénique des eaux destinées à l'alimentation. Elle occupera, j'ose l'espérer, une place honorable à côté de ses aînées, attendu qu'elle permet, bien plus sûrement que celles-ci, de retrouver le bacille d'Eberth introduit à dessein, même à dose infiniment petite, dans une substance quelconque, non antiseptique bien entendu, dans l'eau ou même dans un milieu beaucoup plus complexe tel que les matières fécales.

Quant au procédé de stérilisation des eaux alimentaires décrit dans la deuxième partie, il est encore complètement inédit. Il consiste en principe à filtrer les eaux impures à travers un lit oxydant, complètement insoluble, formé essentiellement de manganate de baryum obtenu par voie humide dans un état

1. R. Cambier. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, CXXXII, p. 1442 (10 juin 1901) et CXXXIII, p. 1226 (23 décembre 1901).

Ibid. *Revue d'Hygiène et de police sanitaire*, 1902.

allotropique spécial. Ce lit oxydant ne fait en définitive subir à la composition chimique de l'eau qui le traverse, aucune modification bien sensible, si ce n'est la destruction totale, par combustion, de toute matière organique ou organisée : l'eau traitée ne réduit plus le permanganate de potassium, et soumise à des ensemencements variés, elle ne donne plus de cultures microbiennes.

En prenant ces recherches expérimentales comme sujet de ma thèse, j'acquitte une faible partie de la dette de reconnaissance contractée à l'égard de M. le Dr P. Miquel qui m'a prodigué la plus inaltérable bonté depuis déjà dix ans que je travaille à ses côtés et qui a bien voulu m'associer à quelques-uns de ses travaux.

J'adresse ici l'hommage de ma sincère affection et de mon dévouement à M. le Dr M. Hanriot qui m'a initié aux méthodes scientifiques et auprès de qui j'ai vécu des années dont le charme sera toujours présent à mon souvenir.

Je prie mes non moins excellents maîtres, M. Etard, M. le Dr Moutard-Martin, M. le Dr Josias et M. le Dr Charrin de vouloir bien accepter l'expression de toute ma gratitude pour les excellents conseils qu'ils m'ont toujours donnés et pour l'heureux temps passé près d'eux dans leurs laboratoires ou dans leurs services.

M. le Dr E. Roux a bien voulu s'intéresser à mes efforts, les guider et m'accorder l'appui précieux de

ses encouragements, je lui en suis profondément reconnaissant.

M. le professeur Armand Gautier m'a témoigné, lui aussi, la plus grande bienveillance et veut bien me faire le grand honneur de présider à ma thèse ; je l'en remercie respectueusement.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

Méthodes d'isolement du bacille d'Eberth.

Je ne crois pas utile de décrire une fois de plus dans tous leurs détails les nombreuses méthodes préconisées depuis vingt ans pour l'isolement et la spécification du bacille d'Eberth dans l'eau, les matières fécales ou autres milieux dans lesquels ce bacille peut se rencontrer normalement ou accidentellement. Ce travail a déjà été entrepris par d'autres, et tout récemment encore M. A. Gautié (1) et M. R. Gèzes (2) en faisaient le sujet de leurs thèses si documentées, contenant chacune un index bibliographique de ces questions si controversées.

1. Dr A. Gautié. *Sur la différenciation et la recherche du bacille d'Eberth et du colibacille*. Toulouse, 1899 (302 pages).

2. Dr R. Gèzes. *De la recherche du bacille d'Eberth dans les eaux d'alimentation*. Lyon, 1902 (136 pages).

Cependant, ayant été amené par les nécessités de mon service journalier à expérimenter personnellement la plupart de ces méthodes, je me permettrai d'en faire une rapide critique et d'en faire ressortir les défauts communs. Ce sera la justification de mes efforts pour perfectionner une technique si délicate et si importante. Car, si la recherche du bacille d'Eberth dans les selles des malades n'intéresse plus que très médiocrement le clinicien, qui possède à l'heure actuelle des moyens bactériologiques autrement rapides et précis (culture du sang, réaction d'agglutination) pour dépister la fièvre typhoïde et ses multiples manifestations, il n'est pas moins vrai que cette même recherche, effectuée sur les milieux divers dans lesquels le bacille typhique a pu être apporté plus ou moins directement par les déjections ou autres excréctions bacillifères des dothiéntériques, est et restera longtemps encore l'une des préoccupations dominantes des hygiénistes désireux d'établir la genèse d'une épidémie et d'organiser une intelligente prophylaxie.

L'extrême difficulté que l'on éprouve d'ordinaire à isoler le bacille d'Eberth des milieux qui le recèlent tient à des causes multiples.

1° Le bacille à isoler n'existe en général dans ces milieux (sauf toutefois dans les matières fécales de certains typhiques) qu'à l'état de rares individus perdus dans la foule des microbes qui les peuplent et qui appartiennent aux espèces les plus variées, banales ou pathogènes.

2° La persistance du bacille d'Eberth dans ces milieux est extrêmement variable avec leur composition chimique, leur réaction acide ou alcaline, avec les conditions de conservation à l'air et à la lumière, avec la nature des espèces microbiennes associées.

3° Dans nos milieux de culture habituels et même dans les milieux spéciaux dits « électifs », le développement du bacille d'Eberth est toujours assez maigre. Ce bacille se trouve trop souvent masqué (quand son développement n'est pas totalement empêché) par la croissance luxuriante de beaucoup d'autres espèces et en particulier par la végétation des colibacilles presque toujours présents, et cela se comprend aisément, là où on peut avoir à rechercher le bacille d'Eberth.

4° Si l'on met à part la réaction d'agglutination (et encore cette séroréaction, pour être démonstrative, doit-elle être effectuée sur une culture pure et dans des conditions expérimentales bien déterminées), on peut dire que le bacille d'Eberth ne possède guère à l'heure actuelle, pour être caractérisé, tel l'argon des chimistes, que des réactions négatives — réactions négatives qui lui sont du reste communes avec un grand nombre d'autres espèces.

C'est à l'une ou même le plus souvent à plusieurs de ces difficultés que viennent se heurter toutes les méthodes, sans aucune exception, proposées pour l'isolement du bacille d'Eberth dans les eaux.

Milieux solides gélatinés. — La méthode générale de Koch d'isolement des espèces sur plaques de gélatine est inapplicable. On ne peut ensementer que trop peu d'eau, un centimètre cube au plus, sous peine de voir le milieu refuser de se solidifier par le refroidissement et l'on risque dès lors de laisser échapper le bacille cherché, toujours peu abondant dans l'eau analysée. Si pour éviter cet inconvénient, capital en l'espèce, on cherche à concentrer les microbes dans un faible volume, par exemple en centrifugeant ou bien en filtrant plusieurs litres d'eau comme l'a proposé Loir en 1887 (1), les plaques ensementées avec les quelques gouttes riches en microbes se couvrent de colonies confluentes ayant perdu toute apparence macroscopique caractéristique, d'où il est impossible de rien séparer, ou bien se liquéfient promptement et le résultat est tout aussi mauvais.

Aussi dès l'origine, a-t-on cherché à additionner la gélatine nutritive de substances capables de s'opposer au développement des bactéries banales et permettant néanmoins la croissance des colonies éberthiennes. En 1887, Chantemesse et Widal (2), proposèrent comme milieu propre à l'isolement du bacille typhique la gélatine-peptone additionnée de phénol (4 à 5 gouttes de solution phéniquée à 5 o/o pour 10 cent. cubes de gélatine). Il est certain que la gélatine phéniquée est bien moins facilement

1. Loir, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, p. 488.

2. Chantemesse et Widal. *Arch. de physiologie*, 1887, IX, p. 252.

envahie par les microbes banaux que la gélatine ordinaire ; elle est donc bien plus rarement liquéfiée. Mais d'autre part, l'action dysgénésique du phénol n'est pas sans influencer défavorablement la croissance déjà si maigre des colonies éberthiennes. Le milieu gélatiné et phéniqué n'est pas du reste électif pour le bacille typhique et beaucoup d'espèces, notamment les colibacilles y végètent même plus abondamment que lui. Enfin l'inconvénient relatif au faible volume que l'on peut ensemençer subsiste et la culture ne peut se faire qu'à basse température (20°), condition peu favorable à un diagnostic rapide.

En 1900, M. Remy (1) fit connaître un milieu gélatiné de préparation assez pénible que j'ai longuement expérimenté en y introduisant quelques modifications que l'auteur lui-même a bien voulu m'indiquer. On introduit dans un matras le mélange suivant finement broyé : asparagine 6 grammes ; acide oxalique 0 gr. 5 ; acide lactique 0 gr. 15 ; acide citrique 0 gr. 15 ; phosphate disodique 5 grammes ; sulfate de potassium 1 gr. 25 ; chlorure de sodium 2 grammes ; on ajoute 1 litre d'eau, 30 grammes de peptone sèche (de Witte) et l'on chauffe à l'autoclave pendant un quart d'heure à 115-120°. Le liquide bouillant est versé sur 150 grammes de gélatine blanche, on agite et après dissolution on alcalinise légèrement avec de la soude. On chauffe à 110° un quart d'heure,

1. Rémy. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, XIV, p. 561.

puis on acidifie le milieu avec de l'acide sulfurique de telle sorte que 10 centimètres cubes du milieu gélatiné soient exactement neutralisés par 0 cme. 2 de soude demi-normale en employant la phtaléine comme indicateur. On chauffe à 100° pendant 10 minutes, on filtre, on ajoute 2 gr. 5 de sulfate de magnésie et l'on répartit le tout par portions de 10 centimètres cubes dans des tubes qu'on stérilise en trois séances dans un courant de vapeur à 100°. Pour l'usage, on liquéfie le contenu d'un tube, et l'on y ajoute 1 centimètre cube de solution chaude de lactose à 25 0/0 et 0 cc. 1 d'une solution de phénol à 2, 5 0/0. On coule le tout dans une boîte de Pétri.

Le milieu de Rémy est tout au plus un milieu différentiel permettant parfois de constater quelques différences d'aspect entre les colonies typhiques et colibacillaires. Ce milieu est *acide*, donc peu propice à la croissance du bacille typhique, et de fait, si l'on sème sur la gélatine de Rémy un mélange de colibacille et de bacille d'Eberth, les colonies de ce dernier n'apparaissent que tardivement et restent très petites. Si l'on considère en outre qu'il n'a rien d'électif et que la plupart des microbes des eaux y poussent parfaitement et même le liquéfient, on voit que le milieu de Rémy ne constitue pas un milieu à recommander. Il ne présente aucun avantage sur la simple gélatine phéniquée de Chantemesse.

La méthode classique d'Elsner (1) qui n'est qu'une

1. Elsner. *Zeitschr für Hygiene*, 1896, XXI, p. 25 et *Presse médicale*, 1896, p. 35.

légère modification du procédé de Max Holz (1) est basée sur l'emploi d'une gélatine nutritive additionnée de jus de pomme de terre et d'iodure de potassium. Ce milieu a une réaction peu propice à la croissance du bacille d'Eberth. Grimbert (2) a proposé de remplacer le jus de pomme de terre, de composition très variable, par un mélange de sels chimiquement définis.

On peut appliquer point pour point au procédé d'Elsner les critiques formulées plus haut : milieu peu électif, facilement envahi par les espèces banales et même liquéfiantes ; le bacille typhique n'y pousse que tardivement et maigrement. La méthode d'Elsner accueillie au début avec tant de faveur est presque complètement abandonnée aujourd'hui, même par les bactériologistes allemands.

Milieux nutritifs liquides. — L'emploi des milieux liquides présente *a priori* sur les milieux précédents deux avantages considérables : on peut y ensemer un volume d'eau suspecte aussi grand qu'on le désire et la culture peut être effectuée à température élevée. Malheureusement, à côté de ces avantages ils présentent un inconvénient capital : c'est qu'on n'a pas réussi à trouver encore un milieu véritablement électif pour le bacille typhique, et que dès lors, dans les milieux liquides la végétation éberthienne se trouve toujours masquée par le dévelop-

1. Max Holz. *Zeitschr. für hygiene*, VIII, p. 143, et *Annales de micrographie*, 1889-90, II, p. 342.

2. Grimbert. *Société de Biologie*, 25 juillet 1896, p. 815.

pement bien plus abondant des bactéries banales, quand il n'est pas totalement empêché par la concurrence vitale de ces espèces banales ou par l'action nocive de leurs produits de sécrétion. De Freudenreich (1), Chantemesse (2), Grimbert (3), etc., ont publié des observations qui ne laissent aucun doute à ce sujet.

On a cherché à entraver le développement de ces espèces vulgaires en ajoutant des antiseptiques aux bouillons ou en effectuant les cultures à température très élevée.

Rodet (4), en 1889, proposa d'ensemencer d'emblée l'eau suspecte dans le bouillon porté à la température de 44,5, le bacille typhique étant capable de se développer jusqu'à 45°. Il est certain que cet artifice est assez efficace, et la méthode de Rodet serait une des plus recommandables si toutefois les nombreuses variétés de colibacilles, c'est-à-dire, les microorganismes dont la présence est la plus gênante dans la mise en évidence du bacille typhique n'étaient eux-mêmes capables de croître à cette température beaucoup mieux et plus vite encore que celui-ci.

Un peu plus tard, Vincent (5) combina la méthode de Chantemesse et celle de Rodet : il chercha en d'autres termes par l'ensemencement de l'eau sur

1. De Freudenreich. *Annales de micrographie*, 1889-1890, II, 1 à 12.

2. Chantemesse. *La Presse médicale*, 1894.

3. Grimbert. *Société de biologie*, 12 mai 1894, p. 399.

4. Rodet. *Société de biologie*, 29 juin 1889, p. 465.

5. Vincent. *Société de biologie*, février 1890, p. 62, et *Annales de micrographie*, 1889-1890, II, p. 432.

bouillon phéniqué tenu à température élevée (42°5) à répondre à tous les desiderata de cette recherche si difficile du bacille d'Eberth dans le eaux : ensemencement d'un volume notable de liquide dans un milieu peu favorable au développement des espèces banales. En faisant des passages successifs en bouillon phéniqué tenu à la température dysgénésique de 42°5 il espérait pouvoir éliminer rapidement ces dernières. Le procédé de Péré (1) n'est qu'une modification de celui de Vincent.

J'ai beaucoup pratiqué ces deux méthodes et leur dois quelques rares succès. Il est cependant impossible de dire qu'elles permettent de retrouver à coup sûr le bacille typhique, introduit à dessein et même en grande quantité dans une eau naturelle contenant en même temps le colibacille. Elles constituent par contre les méthodes de choix pour la recherche du colibacille dans les eaux, mais ce n'est pas là évidemment une bonne référence pour des méthodes destinées en principe à la recherche spéciale du bacille typhique.

La méthode de Parietti (2) consiste à semer l'eau suspecte sur un bouillon additionné de phénol et d'acide chlorhydrique. J'ai expérimenté cette méthode telle quelle ou avec la modification de Wittlin (3). Elle m'a paru, comme les deux précédentes, être tout à fait recommandable pour l'isolement du colibacille,

1. Péré. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891. V. p. 86.

2. Parietti. *In Annales de l'Institut-Pasteur*, 1891 V. p. 413.

3. Wittlin. *Annales de micrographie*, 1896, VIII, p. 89.

mais ne m'a jamais permis de retrouver le bacille d'Eberth. Ce résultat ne m'a pas surpris étant donné l'acidité du milieu.

Procédés récents. — En somme, jusqu'au commencement de l'année 1901, toutes les méthodes proposées pour l'isolement du bacille d'Eberth de l'eau ou des fèces ne sont que des modifications plus ou moins heureuses de la méthode des milieux phéniqués préconisée en 1887 par Chantemesse et Widal et de celle de Rodet publiée en 1889, et l'on peut dire que d'une façon générale les conclusions auxquelles était arrivé Nicolle en 1894 étaient encore parfaitement justifiées, à savoir qu'il était matériellement impossible d'isoler le bacille d'Eberth en présence du colibacille et que de nouvelles recherches s'imposaient pour combler cette regrettable lacune.

Première méthode de M. Chantemesse. — La méthode préconisée en juin 1901 par M. le professeur Chantemesse (1) consiste en principe à filtrer un volume d'eau notable (6 litres) sur bougie Chamberland, de manière à concentrer sous un petit volume la totalité des germes qu'on ensemence alors dans de l'eau peptonée à 3 o/o (peptone Defresne) tenue à l'étuve à 37°. Un dispositif assez complexe permet de renouveler de temps en temps le liquide de culture sans entraîner les germes et de le faire traverser par un courant d'air. Dans ces conditions les microbes pullulent abondamment y compris le bacille typhique qui plus

1. Chantemesse. *Presse médicale*, 5 juin 1901, page 261.

ou moins dénaturé par son séjour prolongé dans l'eau « se gréerait à nouveau », dit M. Chantemesse, « de ses attributs ordinaires, récupérerait la force et la jeunesse qui le rendent facile à différencier des autres germes que charrie l'eau potable ». Quoi qu'il en soit de cette appréciation, l'auteur ensemence sur gélose roulée en tubes d'Esmarch une gouttelette du bouillon de prolifération qu'il a eu soin de centrifuger au préalable pour le débarrasser des microbes les plus gros et les plus lourds. Cette gélose, additionnée de phénol, comme de coutume et solidifiée en couche d'une extrême minceur, mise en incubation à 37° laisserait éclore les colonies colibacillaires entre la seizième et la dix-septième heure, tandis que les colonies typhiques ne s'y montreraient que de la dix-huitième et la vingt-quatrième heure. Il serait dès lors aisé de les distinguer, de les repiquer sur les milieux convenables pour assurer leur identité.

J'ai longuement et soigneusement étudié ce procédé en suivant à la lettre toutes les indications de l'auteur et je dois à la vérité d'avouer qu'il ne m'a pas permis de retrouver le bacille typhique introduit en quantité considérable, en même temps que quelques milligrammes de matières fécales dans un demi-litre d'eau de Seine. Outre que la technique de la méthode est très compliquée et difficile à mettre en pratique pour peu qu'on ait plusieurs analyses d'eau à effectuer journellement, je me demande s'il est désirable de faire proliférer abondamment sur eau de peptone neutre les microbes dont on veut ultérieurement

séparer par la méthode des plaques le bacille typhique. En se reportant aux considérations que je développerai un peu plus loin (p. 36 et suiv.) il est permis d'en douter. Il est clair que dans ces conditions le bacille typhique a beau proliférer, il ne proliférera jamais autant ni si vite que ses très nombreux congénères, saprophytes ou colibacilles, et qu'il se trouvera tellement noyé dans la foule qu'il deviendra bien hasardeux de le retrouver sur les plaques de gélose d'Es-march servant à la séparation. Peut-être arriverait-on à améliorer le procédé en utilisant pour la prolifération un milieu fortement alcalinisé.

Méthode de Drigalsky-Conradi. — Cette méthode (1) a surtout pour but l'isolement du bacille typhique des selles. Elle est basée sur l'emploi de plaques d'agar nutritif additionné de tournesol et de lactose, pour la préparation desquelles nous renvoyons au mémoire original. Ce milieu ne diffère pas beaucoup on le voit du milieu agar-tournesol-lactose préconisé il y a déjà longtemps par Chantemesse et par R. Wurtz (2). Ce qui l'en distingue surtout c'est l'addition d'une petite quantité de crystal-violet (marque Hoechst) qui, à la façon du phénol préconisé dans ce but par Chantemesse, s'opposerait à la pullulation des bactéries banales sur le milieu en question. Selon moi, l'addition de ce crystal-violet

1. Drigalsky et Conradi, *Zeitschrift für Hygiene*, 1902, p. 283 à 300.

2. R. Wurtz. *Arch. de Médecine expérimentale*, 1892, IV, p. 86.

ne présente guère d'avantages, elle aurait même pour inconvénient d'empêcher de saisir, dès le début de la naissance des colonies, le virage de la coloration du milieu. Elle n'est pas non plus sans influencer défavorablement la croissance du bacille typhique, ainsi que j'ai pu m'en assurer directement.

Quoi qu'il en soit, les plaqués de Pétri garnies du milieu solide de Drigalsky-Conradi sont ensemencés par friction superficielle à l'aide d'une baguette de verre arrondie, chargée d'une trace de la matière soumise à l'analyse. Après quelques heures d'étuve (à 37°) les colonies colibacillaires apparaissent rouges et entourées d'une auréole rouge, tandis que les colonies typhiques ne changent en aucune façon la coloration du milieu. Après avoir longuement expérimenté ce milieu soi-disant électif, soit avec des eaux artificiellement infectées de bacille typhique, soit avec des selles de typhiques, je ne trouve aucun avantage sur le milieu beaucoup plus simple de R. Wurtz additionné de phénol, et je partagerais volontiers la mauvaise opinion qu'ont formulé sur lui Krause et Stertz (de Breslau) (1).

Les plaques de milieu Drigalsky-Conradi constituent une simple succédané des plaques de milieu de Wurtz phéniquées, et ne peuvent fournir, à mon avis des renseignements plus complets que ces dernières.

Deuxième méthode de M. Chantemesse.—C'est du

1. Krause et Stertz. *Zeitschrift, für Hygiene* 1903 XLIV, p. 469 à 476.

reste l'opinion de M. le Professeur Chantemesse (1), qui tout récemment rappela l'attention sur ces plaques d'agar-lactose-tournesol-phénol. La méthode qu'il propose sous le nom de *gélodiagnostic* serait applicable à la recherche du bacille typhique aussi bien dans les selles que dans les eaux. Elle comprend en principe quatre temps : 1° pullulation des germes dans l'eau peptonée à 3 o/o à l'étuve à 37°; 2° le bouillon de pullulation (filtré sur papier pour le débarrasser des microbes les plus volumineux, des zoogléas, etc.), est additionné de sérum agglutinant et soumis à la force centrifuge qui chasse dans le culot les amas de bacilles typhiques agglutinés ; 3° ce culot est semencé par friction, comme dans la méthode précédente, non pas sur milieu de Drigalsky-Conradi, mais sur agar-lactose-tournesol phéniqué ; 4° les colonies nées dès la 12^e heure et qui n'ont pas provoqué le virage au rouge du milieu de culture sont repiquées sur les milieux classiques pour être identifiées et soumises à la preuve de la séro-réaction.

Il est à remarquer que, dans le premier procédé de M. Chantemesse on ensemence sur la gélose différentielle le bouillon de pullulation après l'avoir débarrassé par centrifugation des flocons les plus volumineux et des microbes les plus lourds, tandis que dans cette seconde méthode du même auteur, dite *gélodiagnostic*, c'est le dépôt lui-même de cette centrifugation du bouillon de pullulation additionné

1. Chantemesse. *Presse médicale*, 16 juillet 1902, p. 675.

de sérum, que l'on ensemence sur le milieu de différenciation.

J'estime que ce procédé peut être applicable à l'étude des selles (toutes réserves faites sur l'opportunité de la « pullulation » en milieu peu alcalin) n'est pas à recommander pour la recherche directe du bacille typhique dans les eaux.

En terminant cette introduction déjà longue, je voudrais signaler au moins, pour compléter la bibliographie de la question, quelques méthodes très récentes qui ne sont elles-mêmes que des modifications plus ou moins heureuses ou déguisées des méthodes qui viennent d'être indiquées. Ce sont :

La méthode de Schepilewsky (1) : — Ensemencement de l'eau (1 cmc.) sur bouillon (10 cmc.) pour pullulation, à 37° pendant trois à cinq jours ; filtration grossière sur papier et addition de typhosérum au liquide filtré ; centrifugation ; le dépôt délayé dans de l'eau salée physiologique est ensemencé, pour différenciation, sur gélose-lactose-tournesol.

La méthode de Altschüller (2). — Presque rigoureusement identique à la précédente qui ne diffère pas elle-même sensiblement du gélo-diagnostic de M. Chantemesse.

1. Schepilewsky. *Centralbl. für Bakter.* 1903, I (orig.) XXXIII p. 394-400.

2. Altschüller. *Centralbl. für Bakter.* 1903, I (orig.) XXXIII, p. 741-743.

Pour faciliter le dépôt des germes dans les milieux de pullulation, Schüder (1) et Ficker (2) ont proposé de déterminer au sein du liquide la formation d'un précipité capable lui-même de se rassembler rapidement au fond du tube. Ces procédés ne présentent sur celui de Vallet (3) aucun avantage appréciable si ce n'est d'éviter la centrifugation, très longue et très pénible si l'on ne dispose que d'une machine mue à la main.

Enfin la dernière en date des méthodes parues est celle de Hoffman et Ficker (4) basée sur un principe établi par E. Roth (5) et qui consiste à ensemen-
cer les substances suspectes sur un bouillon contenant en solution de la caféine dans la proportion de 0,5 o/o. Dans le bouillon ainsi modifié, la croissance du *bacillus coli communis* serait tout à fait annihilée tandis que le développement du bacille d'Eberth pourrait s'y poursuivre normalement et sans entrave. J'étudie en ce moment ce procédé qui m'intéresse d'autant plus vivement que si le fait annoncé par E. Roth est exact, il y aurait là une possibilité d'améliorer le procédé de recherche du bacille typhique à

1. Schüder. *Zeitschrift für Hygiene*, XLII, p. 317-326.

2. Ficker. *Hygienische Rundschau*, 1904, XIV, p. 7-9.

3. Vallet. *Arch. de méd. expér.*, 1901, p. 557.

4. Hoffmann et Ficker. *Hygienische Rundschau*, 1904, XIV, p. 107. *Archiv. für Hyg.*, 1904, XLIX, p. 229 à 273.

5. E. Roth. *Hygienische Rundschau*, 1903, XIII, p. 489-491. *Archiv. für Hyg.*, 1904, XLIX, p. 199 à 228.

l'aide de la culture en bouillon alcalin et salé contenu dans des bougies Chamberland, selon la technique que je puis maintenant aborder (1).

1. Courmont et Lacomme *Journ. de physiol. et de pathol.*, 1904, IV, p. 286.

CHAPITRE II

Méthode de recherche et d'isolement du bacille d'Eberth basée sur l'emploi des bougies filtrantes

Généralités. — Au cours de recherches sur l'influence réciproque qu'exercent les unes sur les autres les cultures microbiennes séparées par des cloisons poreuses de porcelaine, je constatai avec surprise, le 10 mai 1901, que certaines de ces cloisons se laissent aisément traverser par quelques espèces bactériennes dans les conditions que je vais préciser :

Prenons, par exemple, une petite bougie de porcelaine (bougie Chamberland, marque F) cylindrique, sans embout et vernissée sur une longueur de 1 à 2 centimètres au niveau de l'orifice (ces bougies sont celles qu'on utilise journellement dans les laboratoires pour stériliser par filtration de petites quantités de liquide).

Cette bougie à demi-pleine de bouillon ordinaire est placée dans un large tube à essais (tube à glucosé)

de 3 centimètres de diamètre contenant lui-même quelques centimètres cubes du même bouillon. Tout le système étant stérilisé à l'autoclave à 110°, si nous ensemençons le bouillon contenu à l'intérieur de la bougie avec le fil de platine chargé d'une trace de culture typhique pure, nous pourrions constater déjà après quelques heures d'incubation à l'étuve à 37° que le liquide *qui entoure* la bougie, lequel était primitivement parfaitement limpide, présente maintenant un louche manifeste, indice du passage du bacille à travers la paroi de porcelaine poreuse et de sa culture dans le liquide extérieur (1).



Tous les bacilles typhiques de diverses provenances que j'avais en ma possession se sont comportés de même, à la rapidité du passage près. Les bacilles

1. Cambier, *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 10 juin 1901. CXXXII p. 1442.

les plus mobiles sont ceux qui passent le plus vite ; certains traversent en moins de 10 heures ; d'autres en deux ou trois jours. Un bacille conservé depuis 1896 par des repiquages fréquents sur agar et ayant perdu toute mobilité n'a passé qu'après huit jours.

Les bougies Chamberland marque B et les bougies d'amiante ne se laissent que difficilement traverser dans ces conditions. C'est ce qui explique pourquoi mes observations diffèrent essentiellement de celles de de Freudenreich qui de ses expériences déjà anciennes (1) effectuées avec la bougie marque B, dans des conditions presque identiques aux miennes, concluait que le bacille typhique se montre incapable de franchir la paroi filtrante de ces bougies (2).

Telle est l'expérience fondamentale, basée sur la

1. De Freudenreich. *Annales de micrographie*, 1891-92 t. IV, p. 559 à 568.

2. Les bougies filtrantes ont été également mises à profit, par plusieurs expérimentateurs pour l'isolement de certaines espèces très petites « microbes invisibles » qui en traversent facilement la paroi. C'est ainsi que Loeffler (*Rep. de médecine vétérinaire*, 1898) réussit à isoler le microbe de la fièvre aphteuse et que Roux et Nocard, Ed. Dujardin-Beaumetz, mirent à profit le même principe pour isoler le microbe de la péripneumonie, en filtrant sur bougies Berkefeld (bougies siliceuses en terre d'infusoires) les sérosités contenant ces organismes. Mais il s'agit là de véritable filtration mécanique, les microbes en question étant beaucoup plus fins que les pores des bougies. Dans mes expériences il s'agit plutôt de culture de proche en proche à travers les pertuis capillaires, le passage est évidemment facilité par la mobilité plus ou moins grande des microbes considérés.

curieuse propriété que possède le bacille d'Eberth de traverser rapidement la paroi des bougies filtrantes, qui m'a suggéré l'idée de rechercher ce bacille dans les milieux qui le contiennent : (eau, matières fécales) de la façon suivante :

On sème une certaine quantité de matière suspecte (eau, par exemple) à l'intérieur de la bougie garnie de bouillon et plongeant comme il vient d'être dit dans un tube de bouillon tenu à 37°. Dès qu'un louche se manifeste dans le milieu nutritif extérieur, on prélève à l'aide d'une pipette effilée un peu de ce milieu extérieur qu'on ensemence sur les milieux de différenciation habituels et qu'on soumet à la réaction d'agglutination.

Parfois, lorsque la matière suspecte contient réellement le bacille d'Eberth, le passage de celui-ci est si net qu'on obtient d'emblée une culture pure. C'est ainsi que j'ai pu retirer le bacille d'Eberth introduit en minime quantité dans l'eau de Vanne, soit immédiatement, soit après 18 jours de conservation dans une armoire obscure, et que j'ai pu isoler le bacille typhique de l'eau de Seine et de Marne, ainsi que de l'eau de certaines sources.

Malheureusement, cette propriété de traverser les parois poreuses n'est pas spéciale au bacille typhique. Certains microbes vulgaires ou pathogènes, notamment certaines variétés de colibacilles très mobiles passent aussi rapidement et parfois même plus vite. La culture obtenue est dès lors impure et dans le cas du passage simultané du colibacille et du bacille

d'Eberth, la mise en évidence de ce dernier se trouve très compromise. Il ne reste comme seule ressource, dans ces cas très défavorables, qu'à semer par friction la culture impure sur des plaques de gélose lactosée tournesolée, pour essayer d'en isoler les colonies typhiques pures, ce qui est très aléatoire, attendu que pendant la pullulation dans le bouillon ordinaire le colibacille a toujours pris le dessus sur son congénère le bacille typhique.

Je compris dès cette époque tout l'avantage que je pourrais retirer de l'emploi d'un milieu plus électif que le bouillon ordinaire, milieu qui permettrait principalement la culture abondante et rapide du bacille typhique avec tous ses attributs ordinaires (ténuité et grande mobilité) et qui s'opposerait en même temps, dans la mesure du possible, à la pullulation des variétés colibacillaires et à la mobilité de ces dernières. C'est à établir la composition d'un tel milieu (et ce n'était pas chose aisée) que j'appliquai tous mes efforts. Il fallait que ce milieu fût aussi simple que possible, de façon à pouvoir être obtenu toujours, à peu de chose près dans le même état, aussi renonçai-je vite à l'emploi du bouillon de viande, pour adopter, comme base de mon milieu, une simple solution aqueuse de peptone (Defresne) à 3 o/o, stérilisée à 110°.

C'est cette solution, répartie par doses de 10 cc. dans des tubes stériles, que j'additionnais de doses variables des substances sur lesquelles j'expérimentais et que j'enseménçais comparativement avec les

divers échantillons de colibacilles et de bacille d'Eberth que je possédais (1).

Je cherchai à déterminer : 1^o l'intensité du trouble, que j'admis être proportionnel au nombre des bacilles ; 2^o la mobilité des microbes, que je désignais par les chiffres 0, 1, 2, 3, 4, suivant qu'elle était nulle, très faible, faible, assez grande ou extrême. Pour pouvoir rendre comparables entre eux les troubles que j'observais dans le bouillon, les apprécier non pas mathématiquement, bien entendu, mais d'une façon suffisamment précise par un chiffre, je commençai par établir une échelle de troubles que je vais décrire ici, car elle est capable de rendre des services importants dans les recherches analogues.

On dispose dans une boîte à compartiments une

1. Mes recherches ont porté principalement sur les espèces suivantes :

Colibacille (I.P) (provenant de la collection de l'Institut Pasteur).

Colibacille (L.T) (isolé du pus d'un cas d'appendicite).

B. typhique (W) (provenant du laboratoire de M. Widal).

B. typhique (I.P) (provenant de la collection de l'Institut Pasteur.

Dans le bouillon ordinaire :

Colibacille I.P petit et très mobile, trouble légèrement le milieu et de manière homogène.

Colibacille L.T est plus gros, un peu moins mobile et trouble un peu plus le bouillon que le précédent.

Les deux bacilles typhiques sont très mobiles (W un peu moins cependant que I.P) I.P trouble le bouillon légèrement, W un peu plus fortement avec légère pellicule superficielle et très léger dépôt.

série de tubes à essais, de même diamètre, contenant chacun 10 centimètres cubes d'eau peptonée bien filtrée et limpide, additionnée de formol, de façon à la rendre impropre à la culture des microbes. Le premier tube numéroté 0 est laissé tel quel, dans le second numéroté 1 on introduit une goutte d'une culture bien homogène de colibacille, dans le troisième numéroté 2 on introduit 2 gouttes de cette culture et l'on continue de manière à obtenir toute une gamme de liquides dont le trouble va croissant régulièrement jusqu'à l'opacité complète.

Grâce au formol le trouble de chaque tube reste indéfiniment constant et l'on s'oppose à l'évaporation en scellant à la lampe chacun des tubes de l'échelle.

Pour apprécier le trouble d'une culture de colibacille ou de bacille typhique dans un quelconque des milieux que j'expérimentais, il me suffisait de comparer la culture en question (effectuée bien entendu dans un tube de même diamètre) aux divers témoins de mon échelle et j'arrivais promptement à identifier le trouble cherché avec un des numéros de l'échelle. Pour faciliter l'observation on examine par transparence un réseau formé de traits de plus en plus fins, dessinés au tire-ligne sur une feuille rectangulaire de papier végétal que l'on place à la fois derrière le tube dont on veut connaître le trouble et derrière le tube témoin approprié.

Ce procédé très simple mérite d'être connu des bactériologistes qui pourront en l'employant comparer, par exemple, à de longs intervalles de temps, le

développement de bactéries quelconques dans les liquides transparents sur lesquels ils cherchent à les faire croître.

Après un grand nombre de tâtonnements (action de la chaleur, des antiseptiques, des sérums, etc...) que je crois tout à fait inutile de mentionner ici, pour ne pas allonger inutilement ce mémoire, je fus amené à considérer que l'alcalinité du milieu jouait un rôle prépondérant dans le développement respectif du colibacille et du bacille typhique.

Voici du reste le résumé de quelques mensurations qui le démontrent on ne peut plus nettement.

Expériences (14 novembre 1901). — D'une part à l'aide de 3 cultures fraîches de coli IP, de coli LT et de typhique IP, on prépare 3 émulsions ayant à peu près le même trouble. D'autre part, 3 séries de 9 tubes contenant 10 cmc. d'eau peptonée à 3 o/o reçoivent des doses croissantes de solution stérilisée de soude caustique à 10 grammes NaOH par litre. Ces trois séries de tubes sont respectivementensemencées avec une goutte des émulsions ci-dessus :

Une goutte émulsion coli IP dans chaque tube de la série n° 1 ;

Une goutte émulsion coli LT dans chaque tube de la série n° 2 ;

Une goutte émulsion typhique IP dans chaque tube de la série n° 3 ;

Les 3 séries sont placées ensemble à l'étuve réglée à 37°.

Les chiffres contenus dans la colonne de gauche du tableau ci-dessous indiquent le nombre de gouttes de solution de soude

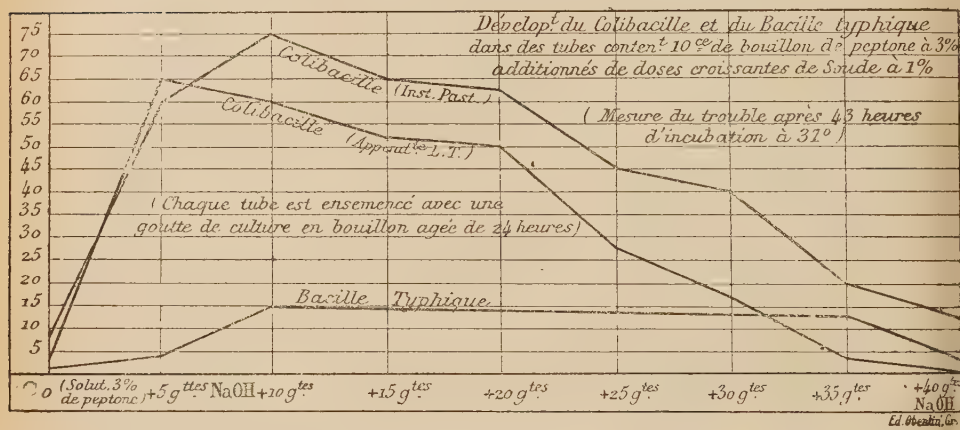
introduites dans les tubes. Les chiffres des 9 dernières colonnes représentent l'intensité du trouble dans les cultures respectives de coli IP, coli LT, typhique IP après 20, 43 et 68 heures d'incubation à 37°, chiffres obtenus au moyen de l'échelle témoin dont il a été parlé plus haut.

Nombre de gouttes de solution NaOH, à 1 o/o ajoutées au 10 ^{me} d'eau pepto- née à 3 o/o.	Intensité du trouble des cultures à 37°								
	Après 20 heures			Après 43 heures			Après 68 heures		
	Coli IP	Coli LT	Typ. IP	Coli IP	Coli LT	Typ. IP	Coli IP	Coli LT	Typ. IP
0	1.5	1	0.5	2	1	0.5	75	37.5	0.5
5 (ogr. 19 NaOH pl.)	40	6	3	60	65	3	75	80	6
10 (0.38)	55	10	4	75	60	14	85	70	30
15 (0.56)	45	22.5	4.5	65	51	14	80	60	20
20 (0.74)	40	16	5	62.5	50	13	80	50	18
25 (0.91)	27.5	5	4	45	27.5	13	50	40	16
30 (1.07)	25	4	4	40	16	12	40	30	14
35 (1.22)	12	0.5	4	20	3	12	30	12	12
40 (1.37)	3	0	0	12	0	3	14	0	6.5

Si sur deux axes de coordonnées rectangulaires nous portons en abscisses les valeurs de l'alcalinité, et en ordonnées l'intensité du trouble des cultures correspondantes, nous obtenons, par exemple pour les résultats observés après 43 heures d'incubation à 37°, le graphique ci-dessous qui nous montre clairement les faits suivants :

1° Dans la solution de peptone non alcalinisée, le développement des colibacilles et celui du bacille d'Eberth sont extrêmement faibles, à cause de la légère acidité naturelle du milieu ;

2^o Pour une alcalinité légère du milieu de culture correspondant à peu près à l'alcalinité des bouillons ordinaires, par exemple 5 à 10 gouttes de soude par 10 centimètres cubes d'eau peptonée, soit encore



o gr. 19 à o gr. 38 NaOH réelle par litre, la croissance des germes passe par un maximum, mais il est aisé de constater, ce qu'on savait déjà *a priori*, que la croissance de deux variétés de colibacilles considérés est infiniment plus grande que celle du bacille typhique ;

3^o A mesure que l'alcalinité va croissant, et ceci est le point particulièrement intéressant, on voit que le développement des deux variétés de colibacilles diminue assez rapidement, tandis que celui du bacille typhique ne subit pour ainsi dire aucune entrave. La courbe représentative de ce dernier est une courbe en plateau, dont l'ordonnée (c'est-à-dire l'intensité du trouble observé) est à peu près la même pour les

alcalinités pourtant fort différentes comprises entre 10 et 35 gouttes de soude à 10/0 ajoutées à 10 centimètres cubes de bouillon (soit de 0 gr. 38 à 1 gr. 22 NaOH réelle par litre). Pour cette forte alcalinité on voit même que le développement des deux colibacilles est devenu très comparable, comme intensité, à celui du bacille typhique.

En d'autres termes, si l'on sème sur bouillon peu alcalin un mélange de colibacille et de bacille typhique le premier étouffera ou masquera sûrement le second ; si au contraire on emploie un bouillon très fortement alcalin, on verra les bacilles typhiques se développer à peu près en même nombre que les colibacilles.

Ces considérations sur l'alcalinité du bouillon me paraissent devoir être de la plus haute importance et dominer la question de la recherche du bacille typhique dans les milieux chargés de colibacilles qui le contiennent d'ordinaire. J'ai fait du reste un grand nombre de déterminations analogues ; toutes m'ont conduit à la même conclusion.

Voici donc un premier point établi : Pour que dans la bougie où l'on sème le milieu suspect, le bacille typhique prolifère au moins autant que les colibacilles, il est indispensable que cette bougie contienne un bouillon de peptone de réaction fortement alcaline (1). Restait à trouver le réactif qui, intro-

1. Il est à noter que dans l'eau de peptone fortement alcalinisée la mobilité du bacille typhique diminue, tandis que celle

duit dans notre eau de peptone fortement alcalinisée, restreindrait le plus possible la mobilité des colibacilles en respectant celle du bacille d'Eberth.

La mobilité des bactéries est en général liée à l'existence de cils vibratiles en nombre plus ou moins grand, et nous pouvions, *a priori*, espérer pouvoir agir sur cette mobilité en faisant varier la pression osmotique du milieu de culture, c'est-à-dire en obligeant le protoplasma bactérien et les cils qui en émanent à se contracter jusqu'à voir leurs fonctions modifiées.

Je me demandai en un mot s'il ne serait pas possible de rendre le milieu de culture isotonique pour le bacille d'Eberth et hyper ou hypotonique pour les colibacilles. Cela devait être possible si les deux espèces ne sont pas rigoureusement identiques.

De fait, en additionnant l'eau de peptone neutre ou alcalinisée de doses croissantes de *sel marin* j'eus la satisfaction de constater que, pour certaines concentrations, le bacille d'Eberth y conservait toute sa mobilité, tandis que les variétés naturellement très mobiles de colibacilles sur lesquelles j'opérais, se développaient, dans ces mêmes conditions de concentration, sous forme de bâtonnets ou de filaments immobiles (1).

des colibacilles est à peu près conservée. Pour une très forte alcalinité le bacille typhique perd le premier sa mobilité.

1. Cambier. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences*, 23 décembre 1901. CXXXIII, p. 1226.

contenant chacun 5 centimètres cubes d'eau de peptone alcaline (0 gr. 38 NaOH par litre) respectivementensemencées de Coli IP et de Typh. IP, on introduit des doses croissantes de solution saturée de sel marin.

Concentration en NaCl par litre.	Série Coli IP.	Série Typh. IP.
0	bacil. très mobiles (3 à 4).	bacilles très mobiles (4).
4 gr. 9	bacil. très mobiles (3 à 4).	bacilles très mobiles (4).
14 gr. 5	bacil. peu mobiles (1 à 2).	bacilles très mobiles (4).
21 gr. 7	bacilles à peu près immobiles (0.5).	bacilles très mobiles (4).
38 gr. 5 (1)	bacilles immobiles (0).	bacilles en général peu immobiles (2 à 3). Quelques-uns sont cependant encore très mobiles.

1. Pour cette forte concentration, le développement des deux microbes est encore abondant.

Expérience (5 déc. 1901). — Sur l'action simultanée de la concentration en soude et en chlorure de sodium. — Des tubes de 10 cmc. d'eau peptonée à 3 o/o, ensemencés respectivement avec une égale gouttelette de culture de Coli IP et de Typh. IP, reçoivent des doses croissantes de soude et de chlorure de sodium.

Concentration par litre en		Coli IP		Typh. IP	
NaOH	NaCl	Développement	Mobilité de 0 à 4	Développement	Mobilité de 0 à 4
0	0	5	2	3	0.5 à 1
	12 gr.	13	»	3	»
	24 gr.	10	3	2	0.5 à 1
	36 gr.	3	0	0	»
0 g. 38	0 gr.	35	3	4	4
	12 gr.	30	2	8	4
	24 gr.	18	»	8	»
	36 gr.	12	0 à 1	5	4
0 g. 74	0 gr.	35	3	10	3.5 à 4
	12 gr.	14	»	9	»
	24 gr.	9	0.5 à 1	8	4
	36 gr.	12	0	8	4
1 g. 07	0 gr.	45	2 à 3	8 à 9	4
	12 gr.	25	0.5	8	»
	24 gr.	15	0	6	»
	36 gr.	12	0	6	4

Cette partie très délicate de mes recherches n'a pu malheureusement être encore terminée, faute de temps, et je compte pouvoir bientôt m'en occuper à nouveau pour améliorer si possible le procédé que je propose.

Quoi qu'il en soit en faisant une sorte de cote mal taillée entre l'action de la soude et celle du chlorure de sodium j'estime que, pratiquement, un bouillon alcalin et salé ainsi constitué :

Solution aqueuse de peptone à 3 o/o 100 cc.

Solution aqueuse de soude (NaOH) à 1 o/o 12 cc.

Solution saturée de sel marin 12 cc.

constitue un excellent terrain pour obtenir des cultures abondantes de bacille typhique très mobile et par contre les colibacilles s'y développent en général moins abondamment et y sont beaucoup moins mobiles que dans les milieux habituels des laboratoires. C'est ce milieu que je fus dès lors conduit à utiliser exclusivement dans mes bougies servant à l'isolement de bacille typhique.

*Technique de la recherche du bacille typhique
dans l'eau.*

Comme cela a été déjà indiqué, il y a grand intérêt à faire porter la recherche sur le plus d'eau possible. Dans ce but je commence par filtrer la totalité de l'échantillon sur une bougie de porcelaine comme

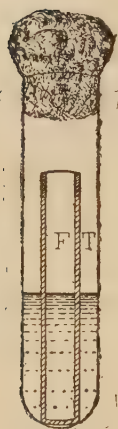
l'a indiqué Loir et je délaye (à l'aide d'un très petit tampon d'ouate stérilisé le léger enduit muqueux ainsi obtenu, renfermant la totalité des microbes, dans 3 ou 4 cme. de bouillon alcalin-salé identique à celui qui sera introduit dans la bougie de culture. Le tube contenant cette émulsion trouble et le tampon est placé à l'étuve à 37° pendant 3 heures ; ceci a pour but de permettre aux germes de se détacher du tampon d'ouate et de commencer leur pullulation. Pendant ce temps on procède à la préparation des tubes à bougies servant à la séparation proprement dite.

On a préparé à l'avance :

1° Une solution aqueuse à 3 o/o de peptone Defresne bien filtrée, qu'on a réparti par doses de 100 centimètres cubes dans des matras bouchés à l'ouate et stérilisés à 110°.

2° Une solution de soude caustique (Na OH) à 1 o/o répartie dans des tubes bien bouchés par doses de 12 centimètres cubes et stérilisée à 110°.

3° Une solution *parfaitement saturée* de sel marin (Na Cl), répartie comme la précédente par doses de 12 centimètres cubes dans des tubes et stérilisée à 110°



4° Des tubes à glucose munis chacun d'une bougie Chamberland (1) très poreuse marque F. Le tout est stérilisé au four Pasteur à 170° (figure)

Au moment d'opérer on verse aseptiquement le contenu d'un tube de soude et d'un tube de sel dans un des matras d'eau peptonée et l'on mélange bien par agitation. Puis à l'aide d'une pipette stérilisée de 20 centimètres cubes on prélève de ce mélange qu'on introduit tout d'abord à *l'intérieur* de la bougie, de façon que l'air inclus dans les

1. Les bougies en question doivent être *neuves* autant que possible ou n'avoir passervi plus de deux ou trois fois. Dans ce dernier cas, on les lave soigneusement et abondamment à l'eau, puis à l'acide chlorhydrique étendue, puis de nouveau à l'eau ; on les essaye pour s'assurer qu'elles ne sont pas fêlées ; on les égoutte, on les sèche doucement à une douce température. On termine la régénération en les chauffant deux heures dans le four à moufle au rouge naissant (de manière à ne pas fondre l'émail voisin de l'orifice).

pores de la porcelaine soit facilement expulsé par le liquide qui y pénètre par capillarité. On apprécie à ce moment le degré de porosité de la bougie : celle-ci est convenable lorsque l'on voit perler rapidement un grand nombre de petites gouttelettes liquides sur sa face externe et il faudrait rejeter toute bougie qui refuserait de se laisser ainsi mouiller rapidement ; on achève de vider le contenu de la pipette dans le tube extérieur. Le petit appareil de culture étant ainsi garni on le place à l'étuve à 37° pendant deux ou trois heures pour permettre aux niveaux du liquide de s'égaliser à l'intérieur et à l'extérieur de la bougie.

Au bout de ce temps, on aspire à l'aide d'une pipette effilée l'émulsion trouble des microbes à étudier, préparée d'autre part, et on l'introduit à l'intérieur de la bougie, en prenant bien entendu toutes précautions pour éviter de laisser couler la moindre trace de cette émulsion au dehors de la bougie. On flambe fortement toute la partie du tube de verre qui dépasse la bougie, on replace la bourre d'ouate et l'on met l'appareil ensemencé en incubation à 37°. Dès la 15^e heure on fera bien de commencer à surveiller l'aspect du bouillon extérieur, qui jusqu'à là est demeuré parfaitement limpide.

Dès qu'un louche s'y manifeste, on prélèvera un peu du liquide extérieur avec une pipette effilée, pour l'étudier (examen microscopique, agglutination, ensemencement par friction sur plaque d'agar-lactose-tournesol ou sur milieu de Drigalsky-Conradi).

Dans le cas où l'eau contient le bacille typhique, ou pourra ainsi obtenir une culture pure d'emblée de ce microorganisme ou simplement mélangée d'une autre espèce dont il sera en général très aisé de le séparer.

En opérant exactement dans ces conditions on ne verra le colibacille traverser la bougie que tout à fait exceptionnellement.

En tout état de cause, dans ce cas tout à fait défavorable, la culture mixte coli-typhique obtenue dans le bouillon extérieur sera assez riche en bacille typhique, pour que de nombreuses colonies de ce dernier puissent être observées sur les plaques de différenciation ensemencées avec ce mélange.

Parfois certaines variétés de *bacillus subtilis* traversent les bougies en même temps que le bacille typhique. Ces microbes très avides d'air venant former un voile à la surface du bouillon contenu dans le tube extérieur, une simple culture d'une goutte de ce bouillon dans un tube de bouillon alcalin soustrait au contact de l'air par une légère couche de vaseline (1) éliminera facilement ces microbes aérobies.

La méthode d'isolement du bacille typhique que je viens de décrire est certainement perfectible. Il y aurait grand intérêt à remplacer les bougies de por-

1. Cette méthode de culture des anaérobies stricts ou facultatifs a depuis longtemps été préconisée par MIQUEL dans son *Manuel pratique d'analyse des eaux* et rebaptisée depuis sous le nom de *Méthode des tubes cachetés*.

celaine par une substance de porosité plus constante.

J'ai essayé à ce point de vue le sable et certaines substances organiques telles que le papier parcheminé, la baudruche, etc., sans y trouver de bien grands avantages. Il serait désirable également de rendre le bouillon encore plus électif à l'égard de la croissance et de la mobilité du bacille d'Eberth et si, comme je le suppose, le succès de la méthode est lié à la parfaite isotonie du milieu de culture pour le bacille typhique, il serait nécessaire de substituer à la peptone commerciale, qui contient toujours des impuretés très difficiles à éliminer, une substance nutritive de composition parfaitement fixe. C'est à satisfaire ces desiderata que j'ai l'intention de consacrer prochainement mes efforts.

Expérience. — Le 6 décembre 1901, à 6 h. 30 du soir, on ensemence sur bougie contenant le bouillon alcalin et salé (eau de peptone à 3 o/o 100 cmc. ; soude à 1 o/o 2 cmc. ; sel marin saturé 2 cmc.) une goutte d'un mélange à parties égales de cultures en bouillon âgées de 24 heures typh. IP + coli IP. Le 7, à midi, le trouble est manifeste dans le bouillon extérieur. Agglutination positive et indiscutable par le sérum, mais incomplète. On ensemence une goutte du bouillon extérieur sur gélose lactosée en piqure profonde, sur lait et sur bouillon ordinaire ; on fait en même temps dans un but de séparation des ensemencements en surface sur plaques d'agar-lactose-tournesol. Le 8, la gélose lactosée a fermenté avec production de bulles, le lait n'est pas coagulé mais le sera le 9. La culture typhique qui a indubitablement traversé la bougie était donc

souillée de colibacille ainsi que l'a montré l'étude des colonies écloses sur l'agar lactosé-tournesolé. La concentration du bouillon en sel et en soude était donc manifestement trop faible.

Expérience. — A la même date, on sème une goutte du même mélange coli IP + typh. IP sur bougie contenant un bouillon plus alcalin et plus salé (eau de peptone 100 cmc., soude 8 cmc., sel 8 cmc.). Le 8, le bouillon extérieur reste clair ; il louchit manifestement dans la matinée du 9. Les microbes qui ont passé sont petits, très mobiles, agglutinables instantanément par le typho-sérum. Ensemencements de contrôle : lait, non coagulé ; gélose lactosée, pas de fermentation ; bouillon, pas d'indol. Le bacille qui a traversé la bougie était donc du bacille typhique à l'état de pureté.

Expérience. — Le 16 décembre on ensemence une bougie (peptone 100 cmc., soude 12 cmc., sel 12 cmc.) avec une gouttelette du mélange à parties égales, coli IP + typh. IP en cultures récentes sur bouillon (bougie n° 1). Une seconde bougie (n° 2) chargée du même bouillon reçoit un quart de centimètre cube d'eau de canalisation qui avait été artificiellement infectée le 27 novembre d'une gouttelette de culture typhique et conservée depuis cette époque à la température de 14°, dans une complète obscurité.

Bougie n° 1 : bouillon extérieur trouvé trouble le 18 ; bacilles très mobiles, agglutinés instantanément par le typhosérum ; ne coagulant pas le lait, ne faisant pas fermenter la lactose ; ne donnant pas d'indol.

Bougie n° 2 : bouillon extérieur trouvé trouble le 18. Le bacille qui a passé est très mobile, s'agglutine instantanément par le typhosérum et possède tous les caractères de culture du bacille typhique.

J'ai pu en appliquant cette méthode des cultures en bougie à l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons d'eaux de sources ou de rivières isoler plusieurs bacilles possédant toutes les propriétés du bacille d'Eberth, y compris l'agglutinabilité. Celle-ci était toutefois toujours inférieure à celle du bacille typhique isolé de l'organisme ; du reste la plupart des auteurs qui ont isolé des bacilles typhiques de l'eau ont noté cette diminution dans l'aptitude à se laisser agglutiner. Des expériences que je n'ai pas à indiquer ici me font croire que toutes les fois que le bacille typhique végète au contact du colibacille, ou dans un milieu contenant les produits solubles de la vie de celui-ci, il perd partiellement et temporairement au moins la propriété d'être agglutiné par le sérum spécifique.

Je ne voudrais pas prétendre que cette méthode que je viens de décrire, en indiquant les recherches expérimentales sur lesquelles elle est fondée, soit capable de conduire infailliblement à la découverte et à l'isolement du bacille typhique dans les milieux polymicrobiens où il existe d'ordinaire. Mais ce que je puis affirmer c'est qu'elle est plus sensible que toute autre et qu'elle m'a toujours permis de retrouver le bacille d'Eberth introduit intentionnellement, en petite quantité dans des milieux les plus impurs comme l'eau d'égoût ou les matières fécales.

Je n'ai fait jusqu'à ce jour que peu d'applications de cette méthode à la recherche du bacille d'Eberth dans les selles des

typhiques. Cependant j'ai pu observer dans le service de M. le Dr Josias, du 16 décembre 1901 au 27 mai 1902, 14 enfants de 10 à 14 ans atteints de fièvre typhoïde, avec séro-diagnostic positif. Les selles de ces 14 malades examinées à plusieurs reprises à divers stades de la maladie ne m'ont permis d'isoler que trois fois en culture pure et deux fois en culture mixte le bacille d'Eberth. D'autre part en étudiant les selles de 11 adultes atteints également de fièvre typhoïde avec séro-diagnostic positif, soignés dans le service de M. le professeur Chantemesse je n'ai pu isoler que deux fois le bacille en question.

Dès le début de mes recherches sur les selles, très surpris des résultats négatifs que j'obtenais, je m'astreignis à ensemercer parallèlement deux tubes à bougie pour chaque selle : l'une avec la matière provenant telle quelle du malade, la seconde avec cette matière intentionnellement additionnée d'une trace de bacille d'Eberth. Or, j'ai toujours pu, dans tous les cas, mettre en évidence à l'aide de cette seconde bougie le bacille que j'avais ajouté dans les selles. La méthode n'est donc pas en défaut et je ne puis expliquer mes soi-disant insuccès que de deux manières : ou bien, le bacille typhique se trouve dans l'intestin, mais alors il différerait sensiblement du bacille qu'on peut isoler de la rate des malades et refuserait de traverser les bougies, ou bien, ce qui est plus vraisemblable, je suppose que le bacille typhique n'est pas aussi fréquent qu'on le pense généralement dans l'intestin et dans les selles. J'ai eu du reste l'occasion d'examiner depuis des selles de typhi-

ques par la méthode de Drigalsky-Conradi dont M. le Dr Bienstock, de Mulhouse, a eu l'amabilité de m'enseigner la technique dans ses plus petits détails. Dans les selles en question je n'ai pas rencontré le bacille d'Eberth, bien que nombre des colonies écloses sur le milieu au cristaill-violet avaient tout à fait l'apparence décrite par les savants allemands comme caractéristique. En faisant à nouveau usage de cette méthode, j'ai pu me convaincre qu'on doit se montrer très rigoureux sur la spécification des germes qu'elle permet d'isoler et pratiquer la séro-réaction, non pas en délayant dans une gouttelette de sérum placée sur le porte-objet une trace des colonies prélevées directement sur la plaque au cristaill-violet, mais bien en suivant la technique précise formulée par Widal, sur des cultures provenant du repiquage des colonies sur bouillon ou sur agar. De cette façon on ne s'exposera pas à considérer comme agglutinables des microbes qui existent déjà enchevêtrés en petits amas dans les colonies considérées, colonies dont l'aspect macroscopique ne se différencie en rien du reste de celui des colonies éberthiennes.

DEUXIÈME PARTIE

On connaît les difficultés presque insurmontables auxquelles on se heurte pour l'épuration bactérienne des volumes énormes d'eau potable destinés à l'alimentation des villes. Il faut en définitive concilier l'efficacité des moyens mis en œuvre et leur prix de revient et parmi les nombreux procédés qui ont été préconisés, seule, jusqu'à ce jour, la filtration par le sable a pu recevoir quelques applications avantageuses. Mais si la filtration pure et simple sur le sable, ou mieux encore cette filtration combinée avec l'emploi d'une substance coagulante comme l'oxyde de fer (par exemple le procédé Anderson) donne d'assez bons résultats avec les eaux de rivière, elle se montre par contre tout à fait impuissante à épurer et à débarrasser convenablement de leurs microbes les eaux de sources qui, cela ne fait plus de doute pour personne aujourd'hui, sont fréquemment l'origine d'épidémies de fièvre typhoïde. Cette différence assez étrange s'explique aisément si l'on fait table rase des idées en cours sur le mécanisme de la filtration par le sable (existence d'une couche biologique, concurrence vitale, etc.), pour admettre tout simplement que la filtration se produit mécaniquement (comme toute filtration du reste) sur la couche de limon et d'argile déposée par l'eau brute à la surface et dans les interstices du lit de sable fin. Les

eaux de rivières, très chargées en limon, se clarifient et s'épurent relativement bien sur le sable, les eaux de sources, habituellement très limpides sont incapables de colmater suffisamment les pores du filtre de sable et ne s'épurent pas du tout.

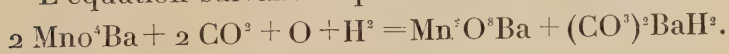
Quoi qu'il en soit de ce mécanisme, les filtres à sable se sont qu'un pis-aller; ils épurent parfois l'eau, c'est-à-dire la débarrassent de tant pour cent de ses microbes, mais ne la *stérilisent* jamais. Quoi qu'on fasse, qu'on augmente l'épaisseur du filtre, qu'on diminue le débit de l'eau qui le traverse, une certaine proportion, essentiellement variable, des microbes de l'eau brute se retrouve dans l'eau filtrée, et le sable est un agent aveugle incapable de distinguer, parmi les microbes qu'il a mission d'arrêter, les inoffensifs des pathogènes. Le colibacille presque toujours présent dans les eaux naturelles traverse très facilement les lits filtrants de sable, et l'on ne concevrait pas que là où ce microbe (qui est toujours, l'indice d'une contamination par des matières fécales) passe, le bacille d'Eberth qui lui est si semblable ne passerait pas non plus lui-même. L'idéal à atteindre était de trouver une substance insoluble qui, mélangée au lit de sable, fût capable de détruire sûrement les microbes au passage sans toutefois altérer en quoi que ce soit la composition chimique de l'eau et sans y introduire aucune trace de substance étrangère ou toxique.

Stérilisation des eaux par le manganate de baryum.

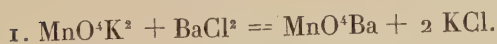
Ce procédé de stérilisation, applicable aux eaux alimentaires, est basé sur l'emploi d'un manganate de baryum obtenu par voie humide en faisant réagir un manganate alcalin et un sel soluble de baryum (1). On obtient ainsi un précipité, répondant à la formule MnO^4Ba , qui, après lavage et dessiccation, se présente sous l'aspect d'une poudre de coloration foncée, violet-noir, très dense, complètement insoluble et inaltérable dans l'eau distillée bouillie.

Par contre, dans cet état allotropique spécial, le manganate de baryum violet, insoluble, est très facilement attaqué par les acides, mêmes les plus faibles et les plus dilués. Lorsqu'on le met en contact par exemple avec de l'eau tenant en dissolution une petite quantité d'acide carbonique ou de bicarbonates de sodium ou de calcium, on voit après quelques minutes de contact, cette eau qui était primitivement incolore se teinter légèrement en rose et acquérir finalement une coloration rouge plus ou moins foncée résultant de la transformation du manganate de baryum insoluble en permanganate soluble.

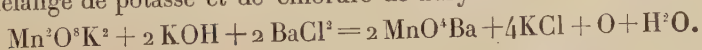
L'équation suivante représente cette réaction :



La moitié du baryum contenu dans le produit pri-



On peut également l'obtenir, moins économiquement, en partant du permanganate de potasse, en traitant ce produit par un mélange de potasse et de chlorure de baryum :



mitif passe en solution à l'état de permanganate, l'autre moitié passe à l'état de bicarbonate peu soluble. Chose remarquable, si l'on effectue cette réaction dans un flacon dans l'atmosphère duquel on a suspendu une bandelette de papier rouge de tournesol trempé au préalable dans une solution d'iode de potassium, on voit cette bandelette bleuir, bien que l'atmosphère du flacon soit riche en acide carbonique. Ceci nous montre que la transformation lente et graduelle du manganate de baryum insoluble en permanganate soluble, sous l'influence de l'acide carbonique et de l'oxygène dissous dans l'eau, s'accompagne de la production d'une certaine quantité d'ozone.

Ce sont ces propriétés extrêmement remarquables du manganate de baryum qui m'ont, dès la fin de l'année 1902, engagé à essayer de l'appliquer à la stérilisation et à la destruction de la matière organique des eaux alimentaires.

Notons dès maintenant que parmi les manganates alcalins terreux, celui de baryum seul peut être utilisé, à cause de son insolubilité complète, absolument comparable à celle du sulfate de baryum. Le manganate de calcium et le manganate de strontium sont trop solubles pour pouvoir constituer des lits filtrants comme ceux que nous décrivons plus loin. Comme manganate insoluble, jouissant des mêmes propriétés, on peut encore citer le manganate de plomb, mais il ne saurait bien entendu être question de ce sel en matière d'épuration d'eaux alimentaires.

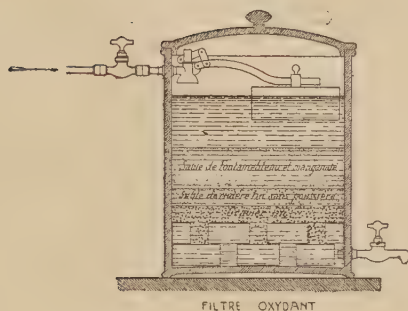
Il est intéressant de remarquer que la solubilité dans l'eau des manganates est absolument parallèle à celle des sulfates correspondants :

	Manganates.	Sulfates.
	—	—
K. Na.	très solubles.	très solubles.
Ca. Sr.	peu solubles.	peu solubles.
Ba. Pb.	insolubles.	insolubles.

La stérilisation de l'eau plus ou moins chargée de germes s'effectue mieux en filtrant ce liquide sur un lit oxydant de manganate de baryum. Mais comme cette substance est obtenue, par le procédé indiqué plus haut, sous forme d'une poudre extrêmement fine et très dense, les lits formés de manganate pur seraient à peu près imperméables à l'eau ; de plus, pour qu'ils présentent une épaisseur suffisante, ils devraient contenir un poids considérable de matière. J'ai donc été conduit dès le début de mes recherches à utiliser des lits filtrants formés non pas de manganate pur mais bien formés de sable et de manganate : l'addition de sable a pour but d'écarter les unes des autres les particules de manganate, et de fournir par conséquent des lits filtrants beaucoup plus perméables ; il faut bien entendu employer un sable assez fin pour que les particules de manganate n'aient aucune tendance à s'en séparer sous l'action du courant liquide ; le sable de Fontainebleau, formation marine de grain très uniforme, m'a donné à ce point de vue les meilleurs résultats. Quant aux propor-

tions respectives de sable et de manganate, je mélange par exemple 50 grammes de manganate avec 1 litre de sable de Fontainebleau ; ce mélange à $1/20$ est effectué par agitation dans un flacon de verre, ou mieux, si on opère sur des quantités notables à l'aide d'un petit tonnelet tournant autour de son axe. Le mélange obtenu, parfaitement homogène, ne doit pas être tamisé ; il se présente sous l'aspect d'une poudre gris noirâtre qui, légèrement humectée, devient tout à fait noire.

Pour constituer un filtre stérilisant d'étude, nous prendrons un récipient quelconque, portant à sa base une tubulure munie d'un robinet. Tout au fond nous disposerons un premier lit de briquettes ou de cailloux volumineux formant drainage ; puis par-dessus quelques lits de graviers de plus en plus fins, puis une couche de sable de rivière criblé, puis enfin une mince couche de quelques millimètres d'épaisseur de sable de Fontainebleau que nous nivellerons avec soin. C'est sur ce support ainsi constitué, qui pourrait être avantageusement remplacé par une mince cloison de terre très poreuse, que nous disposerons enfin le mélange à $1/20$ de sable de Fontainebleau et de manganate qui forme seul la partie vraiment active de tout le système. Dans le plus grand filtre qui a servi pour mes expériences, et qui est représenté par la figure ci-dessous, le drainage a 12 centimètres d'épaisseur, les couches de gravier ont une épaisseur totale de 6 centimètres, la couche de sable de rivière a 3 centimètres, et enfin



la couche de sable manganaté, séparée de la précédente par deux millimètres environ de sable de Fontainebleau pur à une épaisseur de 12 centimètres. Le récipient ayant 40 centimètres de diamètre, soit 14 décimètres carrés de surface, le volume du sable manganaté est d'environ 16 litres, ne contenant en réalité que 800 grammes de manganate de baryum.

Pour mettre notre filtre en action, nous procéderons exactement comme pour un filtre à sable ordinaire ; nous commencerons par l'emplir en faisant pénétrer l'eau par la partie inférieure de façon à chasser l'air inclus ; dès que l'eau affluant de bas en haut aura recouvert de quelques centimètres la masse oxydante, nous achèverons de remplir le récipient de haut en bas par le robinet supérieur.

Le filtre est dès lors prêt à fonctionner, il suffit de régler une fois pour toutes le débit de l'eau fournie par le robinet inférieur. Dans le grand appareil que j'ai utilisé, ce débit a pu être porté jusqu'à 1 litre $1/2$ d'eau à la minute, correspondant par conséquent à un volume d'eau filtrée de 15 mètres

cubes par jour et par mètre carré de surface filtrante.

L'action oxydante du lit manganate neuf sur l'eau qui le traverse n'est pas instantanée et demande environ 12 à 18 heures pour s'établir régulièrement. Pendant les premières heures l'eau sort du filtre avec une teinte rose à peine appréciable, même sous une épaisseur de 1 mètre ; puis cette teinte rose devient de plus en plus visible et devient en définitive comparable comme intensité à celle qu'on obtiendrait en diluant dans un litre d'eau distillée bien pure environ une à deux gouttes d'une solution décimale de permanganate de potassium. Cette teinte se maintient ensuite indéfiniment dans l'eau filtrée fournie par l'appareil tant qu'il reste dans celui-ci du manganate non encore attaqué. D'une façon générale, on peut dire que l'eau sortira du filtre rigoureusement stérilisée et exempte de matière organique soluble tant que sa coloration rose sera nettement appréciable ; au contraire, la disparition progressive de la coloration de l'eau filtrée est un sûr indice que le manganate va bientôt être complètement épuisé et que le renouvellement de la couche oxydante s'imposera à bref délai.

L'épuisement du manganate est du reste extrêmement lent et régulier, il commence par la partie supérieure de la couche oxydante qui perd peu à peu sa coloration noire initiale, et devient brune par suite de la transformation du manganate en oxyde de manganèse. Ce changement de coloration gagne

peu à peu les couches les plus profondes du lit oxydant et l'eau ne sort du filtre complètement incolore que lorsque la totalité du manganate actif a été attaquée et épuisée. On peut admettre comme un minimum qu'un filtre oxydant tel que le plus grand que j'ai utilisé pour mes essais (0 m. 40 de diamètre), chargé de 1 kilogramme de manganate de baryum réel ne sera épuisé qu'après avoir fonctionné d'une façon ininterrompue pendant trois à quatre mois, à raison d'un débit de 10 mètres cubes par jour et par mètre carré de surface, soit seulement après avoir stérilisé de 125 à 180 mètres cubes d'eau suivant l'impureté organique de celle-ci, ce qui industriellement, en admettant que le prix du kilogramme de manganate soit de 1 franc (préparé au laboratoire, en petite quantité, il revient à 2 francs) mettrait le prix de la stérilisation du mètre cube d'eau entre 6 et 8 millièmes, chiffre très acceptable.

Si l'on joint à ces considérations que, contrairement à ce qui se passe avec l'emploi des filtres à sable ordinaires, le débit n'a pas besoin d'être rigoureusement constant, puisque les germes sont tués et brûlés et non pas seulement arrêtés par le filtre ; que la filtration n'a besoin d'aucune surveillance ; que non seulement les germes vivants mais encore toutes les matières organiques, toxines, etc., en dissolution dans l'eau brute sont oxydés complètement, on comprendra tout l'intérêt qu'il y avait à rendre ce système applicable pratiquement à l'épuration des eaux alimentaires.

L'eau qui sort des filtres oxydants à manganate est débarrassée de tout microbe et de matière organique, mais elle est rendue impropre à la consommation par une légère teinte rose qui y persiste indéfiniment (preuve de l'absence complète de matières organiques) et qui est due à la présence dans l'eau traitée d'une trace de permanganate de chaux. On pourrait également prétendre que l'eau traitée, si elle est naturellement dépourvue de sulfates, renferme une trace de bicarbonate de baryum, ce sel n'étant pas rigoureusement insoluble. Dans le but d'éliminer ces deux substances, traces de baryum d'une part, traces de permanganate de chaux d'autre part, voici comment j'opère :

Premier procédé. — L'eau rose stérile est additionnée d'une solution très étendue de sulfate ferreux ; il faut environ une goutte de solution à 5 o/o de SO'Fe par litre d'eau rose. Ce sel, par son acide sulfurique, précipite à l'état de sulfate insoluble la trace de baryum qui pourrait exister dans l'eau et, par son fer, détruit l'acide permanganique en donnant de l'oxyde brun de manganèse insoluble et de l'hydrate de fer. Le léger excès de sulfate de fer se dissocie lui-même en donnant une petite quantité d'hydrate de fer.

A ce moment, l'eau traitée n'est plus rose, elle est légèrement colorée en jaune par des précipités tout à fait insolubles qu'elle tient en suspension et qu'il est très aisé de retenir par une filtration rapide sur une mince couche de sable.

Deuxième procédé. — Ce second procédé beaucoup

plus intéressant, *et qui ne met en œuvre que des substances insolubles*, consiste à modifier légèrement le lit oxydant décrit plus haut en y incorporant du sulfate de strontium naturel (Célestine). Ce sel, si difficilement soluble, suffit à charger l'eau d'une trace de sulfates qui sera largement suffisante pour éliminer à l'état tout à fait insoluble la trace de bicarbonate de baryum que pourrait à la rigueur contenir sans cela l'eau traitée. On peut aussi, dans le cas où l'eau brute est tout à fait exempte de sulfates dissous, la faire passer, avant de l'envoyer sur le lit de sable manganaté ordinaire, dans un récipient contenant quelques fragments de gypse. On obtient par ces deux procédés une eau rose, rigoureusement exempte de baryum. Pour la décolorer il suffit de la diriger sur un lit de fer ou mieux, dans un cylindre rempli de ferraille et tournant lentement autour de son axe (ceci ayant pour but d'empêcher la rouille qui se forme, d'adhérer au métal et de soustraire l'eau à son contact immédiat). On obtient ainsi, comme dans le premier cas, une eau légèrement troublée par des précipités tout à fait insolubles qu'il ne reste plus qu'à éliminer par une simple filtration sur sable.

L'eau décolorée par l'un ou l'autre de ces deux moyens, et filtrée sur sable, est admirablement claire et limpide, et parfaitement propre à l'alimentation.

Sans insister davantage ici sur les dispositifs mécaniques capables de réaliser d'une façon tout à fait automatique et sans aucune surveillance les divers temps de l'opération de la stérilisation des eaux par

filtration sur lits oxydants à base de manganate de baryum et des opérations subséquentes de décoloration et de filtration ultime destinées à mettre l'eau stérilisée en état d'être consommée, je vais indiquer quelques résultats bactériologiques qui mettent bien en évidence la valeur et la sécurité de ce procédé nouveau de stérilisation.

Mais tout d'abord il faut noter que l'eau rose issue du filtre oxydant à manganate n'a pas été uniquement amenée à l'état de stérilité absolue par la faible trace de permanganate qu'elle contient et qui résulte de l'action de l'acide carbonique libre ou faiblement combiné, contenu dans l'eau brute, sur le lit de manganate insoluble. Si en effet nous introduisons dans cette eau rose une trace d'une culture sur agar de colibacille ou de bacille typhique délayée dans de l'eau distillée, ou bien encore si nous additionnons l'eau rose de quelques gouttes d'eau ordinaire non stérilisée; nous pourrions constater, par des ensemencements et des numérations sur gélatine, que, même après un long contact, ces microbes ainsi introduits n'ont pas été détruits. Je ne suis pas éloigné de croire que la petite quantité d'ozone (dont on peut mettre la présence en évidence par les réactifs spéciaux) qui se forme pendant l'attaque du manganate par l'acide carbonique, contribue pour une très large part à la stérilisation de l'eau qui se trouve extrêmement divisée par les matériaux constituant le lit filtrant.

Une seconde remarque qui a selon moi une très grande importance, c'est que l'eau définitivement

décolorée et clarifiée, c'est-à-dire prête à être bue, ne se montre non plus nullement antiseptique pour les microbes qu'on peut y introduire ou qui y sont apportés par les poussières de l'air. Tout au contraire, ces microbes y pullulent aisément, comme le démontre l'expérience suivante :

Expérience. — Le 10 février 1903, on introduit une goutte d'eau d'égout dans un matras contenant 250 centimètres cubes d'eau stérilisée par le MnO^4Ba ; le matras est conservé à la température ordinaire et dans l'obscurité.

Numération immédiatement : 70 bact. p. cmc.

le 10 février : 5400 —

le 14 février : 56000 —

le 25 février : infinité —

C'est là une condition que doit remplir toute eau stérilisée par des moyens chimiques : s'il n'en était ainsi on pourrait en effet craindre qu'une eau, toxique pour des microbes, ne le soit également plus ou moins rapidement pour les cellules infiniment plus délicates de notre organisme.

Expérience. — Le 28 janvier 1903, on dispose dans deux conserves cylindriques identiques à tubulure inférieure, un lit de gravier et un lit de sable de Fontainebleau de 0 m. 10 de hauteur sur lequel on dirige l'eau de la canalisation du laboratoire. Sur le sable de la conserve no 2, on dispose en outre une couche oxydante supplémentaire formée de 90 grammes de sable de Fontainebleau et 10 grammes de MnO^4Ba . Les deux appareils sont réglés de façon à débiter chacun 25 centimètres cubes d'eau filtrée à la minute, leur surface est de 143 centimètres carrés.

	Lit de sable témoin.	Lit de sable avec couche oxydante.
28 janvier	Infinité de bact. p. cmc., pas de coli sur 40 cmc.	Infinité de bact. p. cmc., pas de coli sur 40 cmc.
29 »	Infinité de bact. p. cmc., pas de coli sur 40 cmc.	Infinité de bact. p. cmc. pas de coli (eau incolore).
30 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	116 bact. p. cmc., pas de coli (eau légèrement rose).
2 février	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	2 bact. p. cmc. pas de coli (eau rose).
3 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	3 bact. p. cmc., pas de coli.
4 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	3 bact. p. cmc., pas de coli.
6 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	3 bact. p. cmc., pas de coli.
9 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	3 bact. p. cmc., pas de coli.
12 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	7 bact. p. cmc., pas de coli.
14 »	Infinité de bact. p. cmc., colibacille.	3 bact. p. cmc., pas de coli.
17 »	(Filtre témoin supprimé).	16 bact. p. cmc., pas de coli.
20 »		7 bact. p. cmc., pas de coli.
25 »		5 bact. p. cmc., pas de coli.
27 »		1 bact. p. cmc., pas de coli.
28 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.
2 mars		2 bact. p. cmc., pas de coli.
7 »		1 bact. p. cmc., pas de coli.
13 »		5 bact. p. cmc., pas de coli.
31		la couche oxydante est épuisée l'eau passe incolore.

Expérience. — Le 13 janvier 1903 on met en marche un filtre à lit oxydant de $MnO^4 Ba.$, alimenté par l'eau de la canalisation. Diamètre du filtre 85 millimètres ; surface 58 cm.² ; le lit oxydant supporté par un lit de gravier fin possède une hauteur de 10 centimètres et est formé d'un mélange de 800 grammes de sable de Fontainebleau et 80 grammes de manganate de baryum.

Dates	débit. par minute	Analyse bact. de l'eau filtrée.	Observations.
13 janvier	10 cc. 5	1220 bact. p. cmc., colibacille.	eau incolore.
14 »	10 cc. 6	231 bact. p. cmc., pas de coli sur 40 c. c.	eau rose.
16 »	9 cc.	62 bact. p. cmc., pas de coli.	débit porté à 30 c. c.
17 »	30 cc.	12 bact. p. cmc., pas de coli.	débit porté à 45 c. c.
19 »	40 cc.	26 bact. p. cmc., pas de coli.	débit porté à 59 c. c.
20 »	58 cc.	11 bact. p. cmc., pas de coli.	débit porté à 65 c. c.
21 »	65 cc.	0 bact. p. cmc., pas de coli.	
22 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
24 »		3 bact. p. cmc., pas de coli.	
30 »		1 bact. p. cmc., pas de coli.	
2 février	26 cc. 11 h. Matin.	0 bact. p. cmc., pas de coli.	On gratte la couche d'argile qui a colmaté la surface du filtre. Le débit remonte à 65 cc.
2 »	65 cc. 6 h. s.	0 bact. p. cmc., pas de coli.	
3 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
6 »		5 bact. p. cmc., pas de coli.	
9 »		4 bact. p. cmc., pas de coli.	
12 »		1 bact. p. cmc., pas de coli.	
14 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
17 »		2 bact. p. cmc., pas de coli.	
25 »	19 cc.	0 bact. p. cmc., pas de coli.	
27 »	65 cc.	0 bact. p. cmc., pas de coli.	
28 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
2 mars		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
3 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	On introduit dans l'eau brute une culture de colibac. et de bacille typhique.
4 »		4 bact. p. cmc., pas de coli.	
9 »	35 cc.	» »	Même opérat. que le 2 févr.
11 »	65 cc.	2 bact. p. cmc., pas de coli.	le débit remonte à 65 c. c.
13 »		2 bact. p. cmc., pas de coli.	On met fin à cette expérience.

Les résultats de la journée du 3 mars sont particulièrement intéressants. Ce jour-là, à 1 h. 45 de l'après-midi, nous avons versé dans l'eau surnageant la couche oxydante une émulsion de culture de bacille typhique sur agar et de culture de colibacille. Puis nous avons recueilli des échantillons d'eau filtrée, à intervalles très rapprochés, que nous avonsensemencés, chacun à la dose de 40 cent. cubes, dans du bouillon placé à l'étuve à 37°.

2 h. 5	Eau filtrée	pas de culture
2 h. 20	Eau filtrée	pas de culture
2 h. 35	Eau filtrée	pas de culture
4 h.	Eau filtrée	pas de culture
5 h.	Eau filtrée	pas de culture
6 h.	Eau filtrée	pas de culture
7 h.	Eau filtrée	pas de culture

Expérience. — Le 18 mars 1903 on met en marche un grand filtre à lit oxydant de manganate de baryum. Ce filtre en grès a 42 cent. de diamètre et est disposé comme il est indiqué page 57. Il est alimenté par l'eau de la canalisation du laboratoire.

Dates.	Débit par minute	Analyses bactériologiques	Observations.
18 mars....	245 cmc.	Infinité de bact. colibacille.	L'eau filtrée est jaune et sale.
19 »		1500 bact. par cc. colibacille.	L'eau est claire et incolore.
20 »		39 bact. par cmc. pas de coli.	L'eau filtrée est rose.
23 »	245 cmc.	7 bact. par cmc. pas de coli.	
24 »		3 bact. par cmc. pas de coli.	
2 avril....	245 cmc.	0 bact. par cmc. pas de coli.	le débit est porté à 380 cmc. par minute.
20 »		1 bact. par cmc. pas de coli.	
22 »	380 cmc.	1 bact. par cmc. pas de coli.	le débit est porté à 890 cmc. par minute.
29 »		1 bact. par cmc. pas de coli.	
18 mai....		0 bact. par cmc. pas de coli.	
28 »		0 bact. par cmc. pas de coli.	
20 juin....	800 cmc.	0 bact. par cmc. pas de coli.	
7 juillet...	800 cmc.	1 bact. par cmc. pas de coli.	on mit fin à cette expérience.

Expérience. — Le 9 octobre 1903 on remonte à neuf le grand filtre de grès de 0 m. 42 de diamètre, exactement comme dans l'expérience précédente.

Dates.	Débit par minute.	Analyses bactériologiques.	Observations.
9 octobre.	500 cmc.	Infinité de bact. colibacille.	
11 »		Infinité de bact. colibacille.	
15 »		Infinité de bact. pas de coli.	
27 »		0 bact. par cmc. pas de coli.	le débit est porté à 850 cmc. par minute.
2 novemb.		3 bact. par cmc. pas de coli.	
30 »	850 cmc.	1 bact. par cmc. pas de coli.	le débit est porté à 1000 cc. par minute.
4 décemb.	1000 cmc.	0 bact. par cmc. pas de coli.	le débit est porté à 1500 cmc. par minute.
14 »		4 bact. de cmc. pas de coli.	

Dates.	Débit.	Analyses bactériologiques.	Observations.
19 »		11 bact. par cmc. pas de coli.	
23 »		0 bact. par cmc. pas de coli.	
26 »		1 bact. par cmc. pas de coli.	
28 »		0 bact. par cmc. pas de coli.	
30 »		0 bact. par cmc. pas de coli.	
4 janvier.		0 bact. par cmc. pas de coli.	
6 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
8 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
11 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
13 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
16 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
21 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
26 »		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
31 »		1 bact. p. cmc., pas de coli.	
8 février.		0 bact. p. cmc., pas de coli.	
18 »		0 bact. p. cmc. pas de coli.	
3 mars...	800 cc.	2 bact. p. cmc. pas de coli.	On met fin à l'expérience la couche oxydante paraissant près de s'épuiser.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail, après avoir passé en revue et critiqué les plus connues des méthodes proposées pour la recherche du bacille d'Eberth dans les eaux, j'ai indiqué un procédé qui m'est personnel, basé sur une propriété du bacille typhique qui n'avait jusqu'alors été mise à profit par aucun expérimentateur, je veux parler de sa mobilité, qui lui permet de franchir rapidement la paroi des bougies filtrantes de porcelaine.

Accessoirement, j'ai démontré que les milieux de culture fortement alcalinisés étaient, bien mieux que les milieux neutres ou légèrement alcalins généralement en usage dans les laboratoires, capables de fournir des cultures mixtes de colibacille et de bacille d'Eberth, dans lesquelles le second ne soit pas étouffé ou masqué par le développement luxuriant du premier. J'ai émis l'hypothèse que la mobilité des microbes se trouvait influencée par les variations de la pression osmotique du milieu liquide de culture, et de fait, en faisant varier la concentration de ce liquide en chlorure de sodium, je suis parvenu à rendre les variétés de colibacilles suffisamment

immobiles tout en conservant la mobilité du bacille d'Eberth.

En ce qui concerne la présence du bacille d'Eberth dans les selles de typhiques, je n'ai fait que peu d'expériences, mais j'estime que ce bacille n'y est pas aussi fréquent que l'emploi de la méthode de Drigalsky-Conradi par exemple pourrait le faire supposer.

La seconde partie est consacrée à la description du principe d'un procédé nouveau, qui m'est également personnel, pour la stérilisation des eaux destinées à l'alimentation. J'ai démontré qu'en mélangeant au sable, constituant les filtres ordinaires, une certaine quantité de manganate de baryum, on constituait ainsi des lits puissamment oxydants et insolubles capables de brûler au passage les microbes et la matière organique des eaux qu'on y dirige. Ce procédé est applicable particulièrement aux eaux des sources abondantes, provenant de terrains calcaires, extrêmement sujettes aux contaminations de toute sorte et qu'on ne savait guère, jusqu'à ce jour, épurer efficacement.

Au moment où elle sort du lit oxydant insoluble l'eau est stérilisée à peu près radicalement ; on n'y trouve plus notamment le colibacille presque toujours présent dans l'eau brute, et sa légère coloration rose persistante est un sûr garant de l'efficacité de la stérilisation et de la destruction totale de la matière organique. Après traitement par le sulfate de fer ou mieux par le fer métallique tout à fait insoluble,

et filtration rapide sur une couche de sable, l'eau traitée est parfaitement incolore et limpide, sa composition chimique minérale ne diffère pas sensiblement de celle de l'eau brute, elle ne contient en solution aucune trace de substances toxiques, elle peut en un mot être utilisée pour l'alimentation.

Lorsque, par des méthodes aussi inoffensives pour la santé publique, l'eau distribuée aux habitants d'une ville aura été amenée, au moins pendant un court instant, à l'état de stérilité absolue avant d'être lancée dans les conduites, il nous est bien permis d'espérer que la fièvre typhoïde qui fait encore tant de victimes, malgré que nous sachions en général d'où elle vient, disparaîtra du cadre nosologique.

Vu : le Président de la thèse,

GAUTIER

Vu : le Doyen,

DEBOVE

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

LIARD

